

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461927

研究課題名(和文) 分子生物学的キメラ誘導と抑制性サイトカインを併用した組織再生法の開発

研究課題名(英文) The development of tissue regeneration method using molecular biological chimeric induction and inhibitory cytokine

研究代表者

小高 哲郎 (KODAKA, TETSURO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80442961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫寛容を誘導する目的で、再生組織にレシピエントのMHC Class 1及び²を発現させて分子生物学的キメラを誘導することを目指した。組織として、気管軟骨・胆管上皮を選び、特に気管においては、気管軟骨採取、軟骨細胞の分離、移植手術手技の確立まではできたものの、MHC Class1及び²の発現誘導に成功せず、最終的に報告できる成果を出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：To induce immuno-tolerance, we tried to induce MHC Class 1 and 2 expression on recipient tissue to be molecular chimeric state. We chose tracheal cartilage and bile duct epithelia and succeeded in harvesting them and isolation and tissue transplantation, but we failed in induction of MHC Class 1 and 2. Therefore, we did not get any expected results.

研究分野：小児腫瘍、移植免疫

キーワード：気管軟骨移植 分子生物学的キメラ

1. 研究開始当初の背景

組織工学による再生組織の臨床応用は、皮膚、軟骨、血管、心筋、気管などで行われている。通常、これらの組織再生は、自己組織から細胞を採取しその細胞を増殖して行われているが、体格の小さな小児から大きな組織を採取することは、不可能である。

2. 研究の目的

患児の組織、臓器欠損を同種のドナーから再生した組織を移植することができれば、患児への負担は少なく、必要十分な数の拒絶反応を惹起しない同種細胞を足場に播種し組織を再生することは、小児外科領域の再生医療をより現実的なものとなし得る。また、急激な臓器不全などの際に、現在緊急移植などが行われることがあるが、ドナーが見付からずなくなるケースが多く、今後は緊急避難的な再生組織の移植にて対応するのが望ましいと思われる。そのために、予め同種再生組織を準備しておき、患者のMHCのみを発現できるようにしていれば、今後の緊急医療においても役立てることができる。

3. 研究の方法

これらの問題を解決する為に、充分量細胞が採取可能なドナーサイトから組織を採取し、ドナー細胞の抗原性を低下させた上で、遺伝子導入によるレシピエントMHCを強制発現させて組織を作製し、レシピエントサイトに移植してキメラ状態を作製する方法 (molecular chimerism) を用いた組織再生を意図して行った。

再生組織として、気管軟骨、次いで胆管上皮を対象とし、更に免疫寛容をより強く誘導するために、再生組織に TGF- β 、IL-10 などの抑制性サイトカインの投与も追加して行う予定であった。しかし、過去3年間において、準備段階としての細胞採取、分離、移

植に関する基礎的手技は確立できたものの、MHC class I 及び MHC class II を遺伝子導入により強制発現させる手技が安定せず、最終的には報告できるほどの成果を出すことができなかった。

(1) 軟骨細胞の採取、洗浄、培養

ドナーマウス BaIb/c (H-2d/I-Ad) の気管軟骨を採取し、軟骨細胞を分離、培養する。この際、ドナーMHC class I (H-2d) の発現を低下させるため、洗浄液による攪拌・次いで遠心機を回すことによる洗浄を10回ほど繰り返した後、MHC class I (H-2d) の発現が低下した気管軟骨細胞の分離に成功した。

(2) 再生軟骨の分子生物学的・免疫組織学的検討

再生された軟骨組織をPCRによりドナーMHC class I (H-2d) 遺伝子の発現が低下していることを確認した。また、軟骨組織を免疫組織染色し、ドナーMHC class I (H-2d) の発現が低下していることを確認した。

(3) 再生気管軟骨の同種移植

レシピエントマウス C57/BL6 (H-2d/I-Ab) の頸部気管を一部全層に切除し、その欠損部に作製した再生気管軟骨を移植した。移植に際しては、レシピエントマウス C57/BL6 をケタミン腹腔内投与により鎮静させ、分担研究者らが開発した気道確保システムで気道確保した上で、頸部気管前壁を一部全層に切除した。その欠損部に、上記(2)にて作製した再生気管軟骨を移植し、全週性に縫合固定する。鎮静が覚めた後、気道確保チューブを抜去し、経過観察した。同種移植であり、気管軟骨は予想どおり、全例早期に拒絶された。

(4) 胆管上皮の採取、分離、培養

ドナーマウス BaIb/c (H-2d/I-Ad) の総胆管

を採取し、細切してコラゲナーゼ処理を行って分離、培養する。この際、ドナーMHCの発現を低下させるため、上記(1)と同様のプロトコールにより洗浄を繰り返した後、MHC class I (H-2d)の発現が低下した胆管上皮の分離に成功した。

(5) 再生胆管上皮の分子生物学的・免疫組織学的検討

(2)と同様の方法で、分離した胆管上皮をPCRによりドナーMHC class I (H-2d) 遺伝子の発現が低下していることを確認した。また、胆管上皮を免疫組織染色し、ドナーMHC class I (H-2d)の発現が低下していることを確認した。

(6) MHC class I 及び MHC class II 遺伝子導入システムの確立

レシピエントマウス (C57/BL6) の MHC class I (H-2b) 及び class II (I-Ab) それぞれの DNA 配列をもとにプライマーを作製し、プライマーをもとに PCR により増幅した DNA 断片を市販のベクターに組み込み、クローニングした。このベクターを当初、レトロウイルス (またはレンチウイルス) の下流に組み込み、採取した培養細胞へのトランスフェクションを行う予定であった。ただ、ウイルス実験をできるだけの設備を整えることができず、非ウイルスベクター系のリポフェクション法を用いることを試みたが、もともと不慣れであったこともあり、他の研究室からなんとか学んで習得するまでに時間を要し、何とか習得したものの、MHC class I 及び class II の発現誘導を成功させるところまでには至らなかった。

4. 研究成果

当初の予定では、ドナーマウス Balb/c (H-2d/I-Ad) の気管軟骨にレシピエント C57/BL6 (H-2b/I-Ab) の MHC class I (H-2b)

及び class II (I-Ab) を発現させて、molecular chimerism を誘導すると同時に、IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインを誘導して、移植する予定であった。しかし、最終的に、遺伝子導入における技術的な問題、時間的な問題などがあり、MHC class I 及び II の発現誘導を確立することはできず、最終的に報告できるほどの成果を出すことができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小高 哲郎 (KODAKA TETSURO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80442961

(2)研究分担者

古村 眞 (KOMURA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10422289

星 和人 (HOSHI KAZUTO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30344451

佐竹 亮介 (SATAKE RYOSUKE)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号 70597525